Studien zur Lehre von der Blutgerinnung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Marceli Landsberg

Verlagsbuchhandlung von Julius Springer in Berlin
1913

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
zu Freiburg i. Br.

Dekan: Geh. Hofrat Prof. Dr. Hoche.
Referent: Prof. Dr. Morawitz.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

I. Einleitung.

Seit den grundlegenden Untersuchungen von Alexander Schmidt[1]) gilt als fast allgemein anerkannt, daß die Gerinnung des Blutes in letzter Linie durch Zusammenwirken zweier Substanzen zustande kommt. Das sind das Fibrinogen und das Thrombin.

Das Fibrinogen ist ein globulinähnlicher Eiweißkörper, der sich hauptsächlich im Blutplasma, aber auch im Chylus, in der Lymphe und im Knochenmark findet. Was das Wesen des Thrombins betrifft, so sind die Meinungen darüber recht verschieden: nach Morawitz[2]) existiert das Thrombin als solches im Blute nicht, wohl aber seine Vorstufe, das Thrombogen. Das Thrombogen wird erst bei Gegenwart von löslichen Kalksalzen unter dem Einfluß eines Aktivators, der Thrombokinase, in eine aktive Form überführt.

A. Schmidt[3]), wie auch die Mehrzahl anderer Autoren, wie Hammarsten[4]), Morawitz, Arthus, Fuld-Spiro[5]) u. a. betrachten die Gerinnung des Blutes als eine fermentative Reaktion, die darin besteht, daß das gelöste (oder fein suspendierte) Fibrinogen durch die Einwirkung von Thrombin als Fibrin ausgeschieden wird. Das Thrombin übernimmt hier also die Rolle eines Enzyms, das Fibrinogen diejenige des Substrates.

Die Annahme, daß das Thrombin ein Ferment ist, wird durch folgende, zum Teil schon von Schmidt[6]), zum Teil von späteren Autoren

---

[1]) A. Schmidt, Die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen. Dorpat 1876.

[2]) P. Morawitz, Die Gerinnung des Blutes (Handb. d. Biochemie, herausg. von C. Oppenheimer), II, 2, 56.

[3]) A. Schmidt, l. c.

[4]) Hammarsten, Lehrb. d. physiol Chem.

[5]) Arthus, Fuld und Spiro, zit. nach Morawitz, l. c.

[6]) Schmidt, l. c.

erhobenen Befunde gestützt: das Thrombin setzt in kleinen Quantitäten große Mengen von Fibrinogen um, ohne dabei seine gerinnungserregende Kraft zu verlieren; das Thrombin wird durch Erhitzen auf 100° inaktiv; was das Zeitgesetz der Wirkungsweise des Thrombins betrifft, so fanden Loeb[1]), Duclaux[2]) und Arthus[3]), daß zwischen der Fermentmenge und der Geschwindigkeit der Reaktion eine direkte Proportionalität besteht, nach Fuld dagegen wächst die Gerinnungsbeschleunigung mit der Quadratwurzel aus der Fermentmenge, was der Schütz-Borissowschen Regel entsprechen würde.

Diese Anschauungen werden aber nicht von allen Forschern geteilt.

Schon vor langer Zeit hat Wooldridge[4]) behauptet, die Gerinnung sei kein fermentativer Prozeß, sondern sie käme zustande durch eine Verbindung zweier Fibrinogene, die schon im strömenden Blute vorhanden sind. Die beiden Fibrinogene sollen sich in einem labilen Gleichgewichtszustand befinden, der durch bestimmte äußere Einflüsse gestört wird.

Der Grundgedanke der Auffassung von Wooldridge[5]), nämlich die Annahme einer Wechselwirkung der im Blute enthaltenen Kolloide, fand später seinen Ausdruck in der Theorie der Blutgerinnung, die von Nolf[6]) aufgestellt ist. Nach Nolfs Auffassung sind zum Zustandekommen der Blutgerinnung drei Körper nötig, die sich im Blute befinden: das Thrombogen, das Thrombozym und das Fibrinogen.

Diese drei Substanzen treten zusammen zu einer Verbindung, die, je nachdem ob sie reicher oder ärmer an Fibrinogen ist, zu Fibrin oder zu Thrombin wird. Das Thrombin soll nichts anderes sein, als ein fibrinogenarmes Fibrin. Durch Zusatz von Fibrinogen wird das Thrombin in Fibrin umgewandelt.

Diese drei Körper verbinden sich nur unter dem Einfluß thromboplastischer Substanzen. Darunter versteht Nolf nicht nur Gewebsextrakte, sondern auch alle Momente, die den physikalischen Zustand des Blutes verändern, wie z. B. Körper, die große Oberflächenenergien entwickeln, wie fein gepulvertes Glas, Kohle usw.

Es handelt sich also nach Nolf nicht um einen fermentativen Vorgang, sondern um eine gegenseitige Fällung von Kolloiden.

Während sich Nolf und Wooldridge gegen das Thrombin als gerinnungserregende Substanz wenden, sind andere Autoren, wie Howell,

---

[1]) Loeb, Biochem. Journ. **6**, 21, 1907.

[2]) Duclaux, Traité de Microbiologie, Kap. 17 u. 39.

[3]) Arthus, zit. nach Morawitz, l. c.

[4]) Wooldridge, Die Gerinnung des Blutes. Leipzig 1895.

[5]) Wooldridge, l. c.

[6]) Nolf, Eine neue Theorie der Blutgerinnung. Ergebnisse der inneren Med. und der Kinderheilkunde **10**, 1913.

Iscovesco[1]), Rettger[2]) und Stromberg[3]) der Meinung, daß das Thrombin wohl existiert und zum Zustandekommen der Blutgerinnung notwendig ist; seine Wirkung aber ist vielleicht nicht als eine fermentative aufzufassen.

Besonders bemerkenswert in dieser Richtung sind die Arbeiten von Rettger und Stromberg.

Rettger hat im Thrombin keine einzige Eigenschaft finden können, die für seine Fermentnatur sprechen würde.

Es gelang ihm, eine Thrombinlösung herzustellen, die durch Erhitzen bei 100° nicht inaktiv wurde. Ferner fand Rettger, daß das Thrombin nicht wie andere Fermente ein Temperaturoptimum besitzt, und endlich, daß das van't Hoff-Arrheniussche Gesetz bezüglich des Einflusses der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Reaktionen keine Anwendung bei der Blutgerinnung findet.

Auch die Tatsache, daß das Thrombin, das im Serum inaktiv geworden ist, sich wieder reaktivieren läßt, spricht, nach Rettger, gegen die Fermentnatur des Thrombins.

Auch die Untersuchungen von Stromberg weisen darauf hin, daß die Blutgerinnung eher eine komplizierte Reaktion nicht fermentativen Charakters ist. Nach Strombergs Untersuchungen gestaltet sich das Zeitgesetz des Thrombins recht eigenartig. Während z. B. die Schütz-Borissowsche Regel für das Pepsin nur für geringe Konzentrationen des Fermentes gültig ist, ist sie beim Thrombin nur bei größeren Konzentrationen anwendbar. Bei absteigenden Mengen erlahmt das Thrombin viel rascher, als man dem Grade der Verdünnung nach erwarten könnte. Außerdem bestehen nach Stromberg direkt quantitative Verhältnisse zwischen dem Fibrinogen und dem Thrombin, was auch von Rettger[4]) behauptet worden ist. Besonders eigenartig ist nach Untersuchungen von Stromberg[5]) die Einwirkung der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Gerinnung des Blutes: bei Erhöhung der Temperatur bis 17° wächst die Geschwindigkeit sehr stark, bei weiterem Steigen der Temperatur bleibt die Gerinnungsgeschwindigkeit immer gleich, bis ungefähr 40°, um nachher allmählich zu sinken.

Diese hier angeführten Ergebnisse der Untersuchungen von Stromberg brachten ihn zur Annahme, daß bei der Blutgerinnung nicht eine, sondern mehrere Reaktionen gleichzeitig oder nacheinander verlaufen.

Auf Veranlassung von Prof. Morawitz habe ich den von Stromberg (s. vorher) ausgesprochenen Gedanken weiter ver-

[1]) Howell, Iscovesco, zit. nach Morawitz, l. c.

[2]) Rettger, The coagulation of Blood. Americ. Journ. of. Physiology **24**, 400.

[3]) Stromberg, Methodisches über Blutgerinnung nebst Bemerkungen über das Wesen des Gerinnungsvorganges. Biochem. Zeitschr. **37**, 177, 1911.

[4]) Rettger, l. c.

[5]) Stromberg, l. c.

folgt, denn es schien uns für die Beurteilung aller quantitativen Versuche mit Thrombin und Fibrinogen von der allergrößten Wichtigkeit, festzustellen, ob man denn hier wirklich eine einfache Reaktion zweier Substanzen vor sich hat, oder ob wir in der Gerinnungszeit nur die Resultante mehrerer chemischer Vorgänge vor uns sehen, die bald beschleunigend, bald verlangsamend auf die Hauptreaktion einwirken. Trifft diese Annahme zu, dann muß man natürlich mit allergrößter Skepsis alle jene Versuche betrachten, die darauf ausgehen, aus Beobachtungen an künstlichen Gerinnungsgemischen Schlüsse auf die Art des Vorganges, auf das Zeitgesetz usw. zu ziehen.

Rettger schließt z. B. aus seiner Kurve, daß die Gerinnung von Thrombin + Fibrinogen vielleicht gar kein chemischer Vorgang sei, da sie dem van't Hoff-Arrheniusschen Gesetze nicht im entferntesten enspricht. In der Tat steigt die Reaktionsgeschwindigkeit, wie auch Stromberg fand, bis etwa 17^0, um von da an etwa bis 40^0 gleich zu bleiben.

Prof. Riesenfeld, Abteilungsvorsteher am chemischen Institut, hat mich bei meinen Untersuchungen durch Rat und Tat auf das Wirksamste unterstützt. Er hat mich darauf aufmerksam gemacht, daß der erste Teil (bis etwa 10^0) der Kurve von Rettger durchaus dem van't Hoff-Arrheniusschen Gesetze entspricht, und äußerte die Vermutung, daß sich bei höheren Temperaturen hemmende Wirkungen irgendwelcher Art geltend machen müßten. Jedenfalls erschien ihm — mit Rücksicht auf den ersten Teil der Kurve — diese Annahme wahrscheinlicher, als die Vermutung Rettgers, daß vielleicht überhaupt keine chemische Reaktion sensu strictiori vorläge.

Alle diese Erwägungen ließen es wünschenswert erscheinen, der in der Arbeit von Stromberg enthaltenen Anregung zu folgen.

Meine Aufgabe war es, mit möglichst verschiedenen Gerinnungsgemischen den Einfluß der Temperatur auf die Gerinnungszeit zu studieren, um Anhaltspunkte zur Entscheidung der Hauptfrage zu gewinnen:

„Ist die eigentümliche Temperaturkurve der Gerinnung der Ausdruck eines einzigen Prozesses, oder die Resultante aus mehreren?“

II. Versuchsanordnung.

Stromberg[1]) hat seine Untersuchungen mit Schmidtscher Thrombinlösung und mit $MgSO_4$-Plasma ausgeführt; da aber die Wirkung der Temperatur bei chemischen und physikalischen Reaktionen von äußeren Bedingungen stark beeinflußt wird, habe ich meine Versuche auch mit anderen Agenzien angestellt.

Als Thrombin habe ich die Schmidtsche Thrombinlösung, frisches Serum und auch nach Schmidt aktiviertes Serum benutzt.

Die Thrombinlösung wurde in folgender Weise dargestellt: 1 Teil frischen Serums wurde mit 20 Teilen $95^0/_0$igen Alkohols versetzt. Dabei fallen alle Eiweißkörper des Serums mit dem Thrombin aus. Nach mehrtägigem Stehen wird das Präcipitat durch Filtrieren vom Alkohol befreit, im Exsiccator getrocknet und fein zerrieben. Kleine Mengen davon werden mit Wasser extrahiert. Das filtrierte Extrakt stellt eine leicht opalescente, eiweißarme Flüssigkeit dar und enthält recht große Thrombinmengen.

Eine natürliche Thrombinlösung ist das Blutserum. Sein Gehalt an Thrombin ist im ganzen nicht sehr erheblich: ein Teil des freien Thrombins wird vom Fibrin festgehalten, ein anderer Teil geht nach Gerinnung bald in eine inaktive Form — Metathrombin — (Morawitz[3]) über. — Das Metathrombin wird, wie schon Schmidt gezeigt hat, durch entsprechende Behandlung wieder in Thrombin umgewandelt[4]). Ich verfuhr in dieser Weise, daß ich bestimmte Mengen eines wenig wirksamen Serums mit derselben Quantität $^n/_{10}$-NaOH versetzte.

Das Gemisch wird bei Zimmertemperatur 15 bis 20 Minuten lang gehalten und nachher mit $^n/_{10}$-HCl zurückneutralisiert. Die so behandelten Sera zeigen eine sehr hohe Aktivität, die diejenige des nativen Serums stark übertrifft. Besonders groß ist der Unterschied zwischen dem frischen und aktivierten Pferdeserum.

---

[1]) H. Stromberg, l. c.

[2]) P. Morawitz, Die Blutgerinnung. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Hsg. von E. Abderhalden. **3**, 225, 1911.

[3]) Morawitz, l. c.

[4]) Morawitz, l. c.

Frisches Serum wurde in üblicher Weise von spontan geronnenem Blute abgehoben und im Falle einer Beimischung zelliger Elemente zentrifugiert oder filtriert.

Zur Zubereitung dieser Substanzen diente mir Rinder-, Kaninchen- und Katzenblut.

Als Fibrinogenlösungen, resp. als Substrat der Gerinnung, sind von mir das $MgSO_4$-Plasma nach A. Schmidt und die Fibrinogenlösung nach Hammarsten-Nolf[1]) benutzt worden.

1. $MgSO_4$-Plasma.

3 Teile Blut (frisch aus der Carotis) werden in 1 Teile konzentrierter (28 %iger) $MgSO_4$-Lösung aufgefangen. Das Blut wird kräftig durchgeschüttelt und zentrifugiert. — Das klare Plasma wird mit einer Pipette abgehoben, filtriert und im Eisschrank aufbewahrt. Vor der Verwendung wird das Plasma mit 0,9 %iger NaCl-Lösung 7fach verdünnt. (Eine 4fache Verdünnung mit destilliertem Wasser ist ebensogut verwendbar.)

2. Fibrinogenlösung nach Hammarsten-Nolf.

Frisches Pferdeblut wird in einem großen Gefäße aufgefangen, das eine $2^1/_2$ %ige Natriumoxalatlösung enthält. Das Verhältnis der Oxalatlösung zum Blute ist wie 1 : 20. Das Blut wird kräftig geschüttelt und stark zentrifugiert. Das Plasma wird abgehoben, filtriert und im Eisschrank aufbewahrt. Nach 24 Stunden wird das Plasma von dem sich bildenden weißen Niederschlage noch durch mehrmaliges Filtrieren befreit.

Eine bestimmte Menge kalten Plasmas wird mit dem gleichen Volumen konzentrierter, kalter, chemisch reiner NaCl-Lösung versetzt. Die dabei ausfallenden groben Flocken von Fibrinogen werden in Wasser mit einem Hornlöffel übertragen und dort gelöst. Die Lösung wird wiederum mit NaCl behandelt; das gefällte Fibrinogen wird abgehoben und in einem Quantum Wasser, das der ursprünglichen Menge von Plasma gleicht, gelöst. — In dieser Weise verfährt man weiter, bis die wässerige Fibrinogenlösung oxalatfrei wird. — Die Lösung ist je nach Verlusten beim Übertragen des Fibrinogens mehr oder

---

[1]) Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie. 7. Aufl. S. 242.

weniger konzentriert. Der Salzgehalt schwankt zwischen 2 und 4 % NaCl.

Die so hergestellte Fibrinogenlösung gerinnt spontan nicht, auch nicht durch Zusatz von $CaCl_2$ oder von Gewebsextrakten (Thrombokinase), wohl aber durch Thrombin.

III. Eigene Versuche.

A. Versuche mit $MgSO_4$-Plasma und Schmidtscher Thrombinlösung.

Ich habe zuerst die Versuche über den Einfluß der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Gerinnung bei der Kombination $MgSO_4$-Plasma + Schmidts Thrombin ausgeführt.

Je 2 Reagensgläser, von denen die einen je 2 ccm Plasma, die anderen je 2 ccm Thrombin enthalten, werden in ein Wasserbad von bestimmter, möglichst konstant gehaltener Temperatur gebracht. Sobald der Inhalt der Röhrchen dieselbe Temperatur wie das Wasserbad zeigte, wurde dem Plasma das Thrombin zugegeben und die Zeit notiert. Durch mehrmaliges, aber sehr vorsichtiges Neigen des Röhrchens wurde die Gerinnung festgestellt und die Zeit wiederum notiert.

Es ist ziemlich schwer, denjenigen Zeitpunkt exakt anzugeben, wo die Gerinnung eingetreten ist; auf vollkommene, totale Gerinnung zu warten war nicht angezeigt wegen der sich rasch ändernden Temperatur des Wasserbades. Ich habe deswegen als Gerinnungspunkt denjenigen Zeitpunkt aufgefaßt, wo das Plasma (und das zugesetzte Thrombin) aus dem horizontal gehaltenen Röhrchen nicht mehr ausfloß.

Durch größere Übung erhält man in dieser Weise gut übereinstimmende Resultate.

Da die Gerinnung in hochgradiger Weise von der Beschaffenheit des Glases beeinflußt wird, habe ich mit möglichst sauberen, trockenen und gleichen Reagensgläsern experimentiert.

Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur läßt sich am besten durch Ausführung der Temperaturquotienten ausführen.

Als Temperaturquotienten für ein Temperaturintervall von 10° bezeichnet van't Hoff[1]) das Verhältnis der Reaktionskonstante k bei Tem-

[1]) van't Hoff, Vorlesungen über theoretische und physikalische Chemie. Heft 1. Braunschweig 1898.

peratur $t + 10$ zu der Konstante bei Temperatur t; in einer Formel ausgedrückt:

$$Q_{10} = \frac{k_{t+10}}{k_t}.$$

Der Quotient schwankt nach van't Hoff für gewöhnliche chemische Reaktionen zwischen 2 und 3.

Aus technischen Gründen war es mir schwierig, die Temperatur des Wasserbades bei 0° konstant zu halten. Außerdem gerinnt das Plasma bei 0° nur sehr träge, und zu einer richtigen Gerinnung kommt es überhaupt nicht. Es bilden sich nur feine Fibrinflöckchen, die sich auf dem Boden des Glases absetzen. Deswegen habe ich nicht bei 0°, sondern bei + 1° gearbeitet.

Tabelle I[1]).

1 bis 10°.

Temperatur	Gerinnungszeit in Minuten						
1°	9	9½	16	17	18	22	35
10°	4	3½	6	7	7½	9	14
Datum	17. VII.	8. VII.	9. VII.	10. VII.	18. VII.	20. VII.	14. VII.

Der Temperaturquotient beträgt hier im Durchschnitt 2,5.

Tabelle II.

5 bis 15°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten							
5°	5	9	10	11½	13	16	17	22
15°	2½	5	5	6	6½	7½	8	10
Datum	8. VII.	9. VII.	4. XI.	10. VII.	18. VII.	20. VII.	26. X.	14. VII.

Q_{10} gleicht für Intervall 5 bis 15° — 2.

[1]) Die hier angeführten Zahlen sind immer Durchschnittswerte von mehreren, am selben Tage und mit demselben Material ausgeführten Versuchen.

Tabelle III.

10 bis 20°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten								
10° 20°	7 4½	3½ 2	6 4	7½ 5½	9 5½	12½ 8	11 7	13 6	14 8
Datum	8. VII.	10. VII.	9. VII.	18. VII.	20. VII.	20. X.	26. X.	8. XI.	14. VII.

Quotient = 1,5.

Tabelle IV.

15 bis 25°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten						
15° 25°	6½ 5½	5 3	2½ 2	3½ 3	7½ 5½	8 7	9½ 8
Datum	18. VII.	9. VII.	8. VII.	6. XI.	20. VII.	26. X.	14. VII.

Quotient = 1,2.

Tabelle V.

20 bis 30°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten								
20° 30°	6 6	4 3	8 8	7 7½	8 7½	12 11½	2 2	5½ 5½	4½ 4½
Datum	8. XI.	9. VII.	14. VII.	26. X.	28. X.	23. X.	8. VII.	18. VII.	10. VII.

Quotient = 1,02.

Tabelle VI.

25 bis 35°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten							
25° 35°	6 7	7½ 10	2 4	11½ 13	5½ 6	2 4	3 4	8 10½
Datum	8. XI.		8. VII.	23. X.	18. VII.	5. XI.	9. VII.	14. VII.

Der Quotient beträgt hier —1,3; er ist negativ geworden.

Wie aus der Fig. 1 ersichtlich ist, wächst die Geschwindigkeit der Gerinnung bei steigender Temperatur nur bis 18 bis 20°, bis 30° bleibt sie beinahe unverändert, um oberhalb 30° zu sinken. Die Quotienten

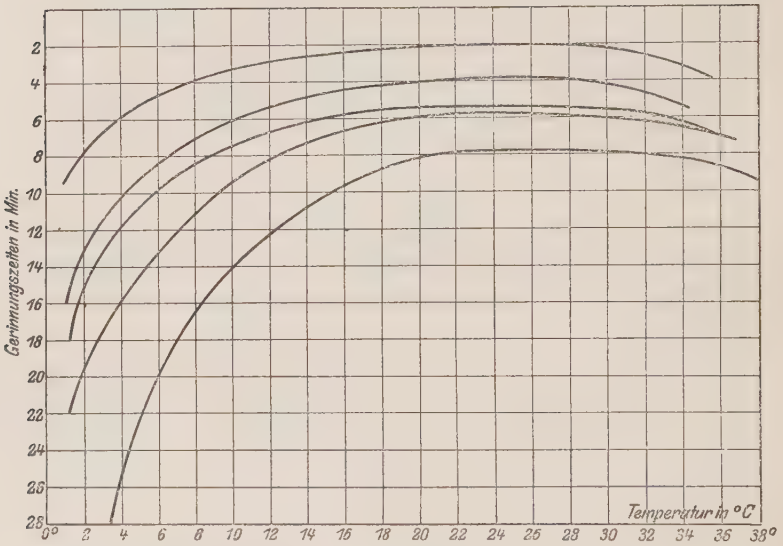

Fig. 1. $MgSO_4$-Plasma 2 ccm + Schmidts Thrombin 2 ccm.

fallen mit steigender Temperatur ab, um zwischen 25 und 35° negative Werte zu erreichen, wie die Tabelle VII zeigt.

Tabelle VII.

Temperaturintervall	Quotienten
1 bis 10°	2,5
5 „ 15°	2,0
10 „ 20°	1,5
15 „ 25°	1,2
20 „ 30°	1,02
25 „ 35°	−1,3

Diese Resultate bestätigen also den Befund von Rettger[1]) und Stromberg[2]), die fanden, daß oberhalb 17 bis 18° die Erhöhung der Temperatur auf die Ge-

[1]) Rettger, l. c.
[2]) Stromberg, l. c.

schwindigkeit der Blutgerinnung keinen merkbaren Einfluß ausübt.

Die genannten Autoren aber haben die Verlängerung der Gerinnungszeiten erst bei 39 bis 41° eintreten sehen, während in meinen Versuchen schon zwischen 30 und 35° eine Verlangsamung der Reaktion festzustellen war.

B. Versuche mit Fibrinogen- und Thrombinlösung.

Bei niedrigen Temperaturen, also unterhalb 10°, verläuft die Gerinnung sehr langsam, und der Gerinnungspunkt läßt sich wegen mangelhafter Erstarrung sehr schwer feststellen. Da die Reaktion bei niedrigen Temperaturen nach allgemein gültigen chemischen Gesetzen verläuft und weil mich nur die Verhältnisse oberhalb 15° interessierten, erschien es mir überflüssig, den Verlauf der Gerinnung zwischen 0 und 10° näher zu untersuchen. Der Quotient für das Intervall 0 bis 10° = 2,8.

Tabelle VIII.

10 bis 20°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten					
10°	10½	20	25	28	24	17
20°	5	9	8½	13	11	7
Datum	5. X.	7. X.	10. X.	15. X.	13. X.	11. X.

Quotient = 2,4.

Tabelle IX.

15 bis 25°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten					
25°	20	21	13	12	15	11
35°	10	11	7	6	7	5½
Datum	15. X.	16. X.	7. X.	12. X.	22. X.	11. X.

Quotient = 2,0.

Tabelle X.

20 bis 30°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten										
20°	5	6	7	5	7	8½	7½	9	13	9½	11
30°	3	3	5	3½	4	5½	5	5½	8	6	7
Datum	5. X.	3. X.	11. X.	4. X.	14. X.	10. X.	12. X.	7. X.	15. X.	22. X.	13. X.

Quotient = 1,7.

Tabelle XI.

25 bis 35°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten							
25°	4	3½	6	7	11	7	10	5½
35°	3	2½	4½	4½	7½	5½	7½	4½
Datum	14. X.	5. X.	12. X.	7. X.	16. X.	22. X.	15. X.	4. XI.

Quotient = 1,35.

Tabelle XII.

30 bis 40°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten							
30°	3½	5½	3	4	5	8	3	6
40°	5	6	4	5	5	8	4	7½
Datum	14. X.	7. X.	5. X.		12. X.	15. X.	4. X.	22. X.

Quotient = — 1,15.

Tabelle XIII.

Temperaturintervall	Quotienten
1 bis 10°	2,8
10 „ 20°	2,4
15 „ 25°	2,0
20 „ 30°	1,7
25 „ 35°	1,35
30 „ 40°	— 1,15

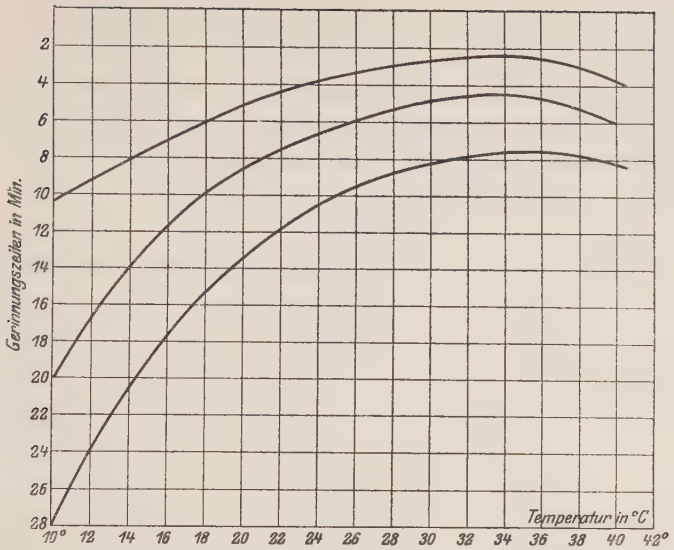

Fig. 2. Fibrinogenlösung 2 ccm + Thrombin (Schmidt) 2 ccm.

Die Fig. 2 ergibt folgendes:

Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt beim Erhöhen der t^0 bis ungefähr 37^0; bei 40^0 läßt sich schon eine Verzögerung der Reaktion wahrnehmen. Zwischen 37 und 40^0 liegt ein Punkt, wo die Reaktion am raschesten verläuft; das ist also der optimale Punkt.

Was die Quotienten betrifft, so sind sie im allgemeinen größer und fallen nicht so stark herab wie bei der Kombination $MgSO_4$-Plasma und Thrombin.

Rettger[1]), der ebenfalls mit Fibrinogenlösung experimentiert hat, bekam ganz andere, der Kurve I ähnelnde Resultate.

Es liegt das vielleicht daran, daß er mit Howellschem Thrombin[2]) seine Untersuchungen ausgeführt hat. Das Thrombin nach Howell ist viel eiweißreicher, wie das von mir benutzte Schmidtsche Thrombin[3]). Daß der Gehalt der Lösung an Eiweiß für die Reaktionsgeschwindigkeit nicht ohne Belang ist, will ich unten ausführlicher behandeln.

---

[1]) Rettger, l. c.

[2]) Morawitz, l. c.

[3]) Das getrocknete Alkoholpräcipitat des Serums wurde nur sehr kurze Zeit, etwa 10 bis 15 Minuten, mit Wasser bei Zimmertemperatur extrahiert.

C. Versuche mit nach Schmidt aktiviertem Serum und mit Fibrinogenlösung.

Bei diesen Versuchen habe ich stets zu 2 ccm Fibrinogenlösung 2 ccm mit $^{n}/_{10}$-NaOH aktivierten Serums zugegeben. Es wurden nur die t^0 oberhalb 10^0 berücksichtigt.

Tabelle XIV.

10 bis 20°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten			
10° 20°	34 15	22 10	46 20	60 27
Datum	15. XI.	16. XI.	17. XI.	20. XI.

Quotient = 2,2.

Tabelle XV.

20 bis 30°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten					
20° 30°	45 25	15 7	33 17	10 5	$7^1/_2$ 4	20 10
Datum	18. XI.	15. XI.	14. XI.	16. XI.	12. XI.	17. XI.

Quotient = 1,9.

Tabelle XVI.

30 bis 40°.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten						
30° 40°	7 4	17 10	6 $3^1/_2$	20 13	15 $10^1/_2$	10 6	5 3
Datum	15. XI.	14. XI.	13. XI.	11. XI.	10. XI.	17. XI.	16. XI.

Quotient = 1,6.

Tabelle XVII.

Temperaturen	Quotienten
10 bis 20°	2,2
20 „ 30°	1,9
30 „ 40°	1,6
40 „ 50°	Negative Werte

Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt hier bis ca. 40°[1]), um von dort ab zu sinken. Auch hier haben wir es mit einem Temperaturoptimum zu tun, welches etwas oberhalb 40° liegt.

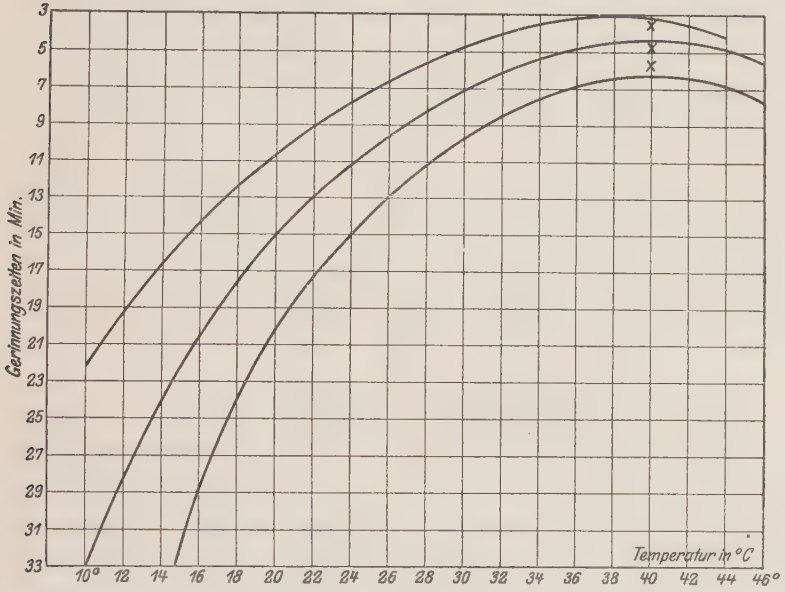

Fig. 3. Aktiviertes Serum + Fibrinogen.
× = „Optimum".

D. Versuche mit frischem Serum und mit $MgSO_4$-Plasma.

Die hier vorliegenden Verhältnisse ähneln denjenigen bei den Versuchen: Fibrinogenlösung + Thrombin. Deswegen erwähne ich hier nur die Quotienten.

Tabelle XVIII.

Temperaturintervalle	Quotienten
10 bis 20°	2,2
15 „ 25°	2,0
20 „ 30°	1,8
25 „ 35°	1,45
30 „ 40°	−1,14

Wie die Tabelle XIX zeigt, liegt das Optimum zwischen 36 und 40°.

[1]) Vgl. Fig. 3.

Tabelle XIX.

Temperatur	Gerinnungszeiten in Minuten			
30°	$3^1/_2$	7	6	5
36°	3	6	5	$4^1/_2$
40°	4	8	$7^1/_2$	5
Datum	22. XI.	23. XI.	26. IX.	27. IX.

E. Versuche mit aktiviertem Serum + $MgSO_4$-Plasma.

Die Gerinnungsgeschwindigkeit des $MgSO_4$-Plasmas beim Zusatz von aktiviertem Serum folgt denselben Gesetzen, wie die bei der Kombination: frisches Serum + $MgSO_4$-Plasma.

Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37°.

IV. Ergebnisse der Temperaturversuche.

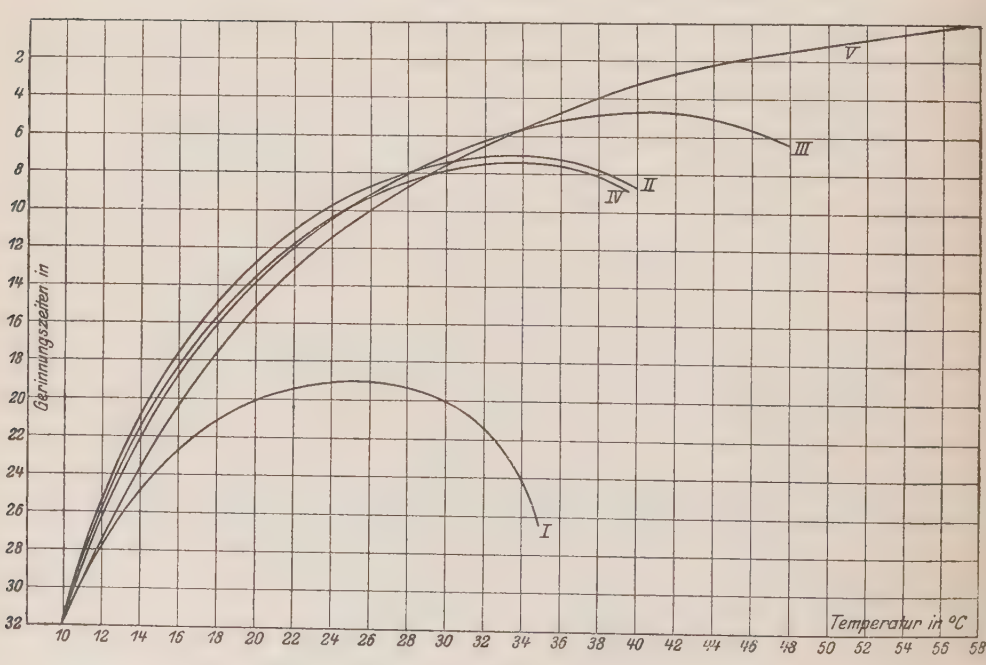

Fig. 4.

Kurve I = $MgSO_4$-Plasma + Thrombin.
„ II = Fibrinogenlösung + Thrombin.
„ III = $MgSO_4$-Plasma + natives Serum.
„ IV = Fibrinogenlösung + aktiviertes Serum.
„ V = Chemische, nicht enzymatische Reaktion mit $Q_{10} = 2$.

Die Kurventabelle IV ergibt folgendes:

Die Reaktion der Gerinnung wird beschleunigt mit dem Ansteigen der Temperatur bis 37° in Kombinationen: Serum + Plasma, aktiviertes Serum + Plasma, Fibrinogen + Thrombin; bis 41° in der Kombination aktiviertes Serum + Fibrinogen. Bei weiterer Wärmezufuhr wird die Gerinnungszeit verlängert.

Wesentlich anders liegen die Verhältnisse bei der Kombination Plasma + Thrombin. Hier sind die Quotienten schon im Intervall zwischen 10 und 20° viel geringer wie bei anderen Kombinationen: 1,7 gegen 2,3 (durchschnittlich); die Zunahme der Reaktion an Geschwindigkeit erfolgt beim Steigen der Temperatur nur bis 18 bis 20°. Im Intervall zwischen 20 und 30° bleibt die Gerinnungsgeschwindigkeit im großen ganzen die gleiche; der Quotient gleicht aber nicht 1, er übersteigt diese Zahl ein wenig (1,05), doch kann der geringe Unterschied (0,05) durch Versuchsfehler bedingt werden. Oberhalb 30° kommt es zu einer deutlichen Verlangsamung der Reaktion.

Somit stimmen die oben angeführten Befunde mit denen von Stromberg im wesentlichen überein: bei der Gerinnung des $MgSO_4$-Plasmas (durch Thrombin hervorgerufen) läßt sich ein scharf begrenzter optimaler Punkt nicht feststellen; die Reaktion steigt bis 17° an, zwischen 17 und 30° ist sie unverändert (nach Stromberg bis 39 bis 41°), um nachher zu sinken.

Diese Regel gilt nach meinen Untersuchungen nur für die Kombination Plasma + Thrombin. Andere Kombinationen, wie auch diejenige mit Fibrinogen + Thrombin, die nach Rettgers Versuchen dieselben Eigenschaften zeigt wie die Kombination $MgSO_4$-Plasma + Thrombin, besitzen einen ausgesprochenen optimalen Punkt, der, je nach der Kombination der Reagenzien, bald höher bald tiefer liegt.

Wie ist dieses eigenartige Phänomen, dem von Rettger[1]) und Stromberg[2]) solche Bedeutung zugesprochen wird, zu erklären?

Es liegt auf der Hand, daß der Prozeß der Blutgerinnung bei verschiedenen Kombinationen der in Reaktion eintretenden Körper eine optimale Temperatur, ja einen ausgesprochenen

---

[1]) Rettger, l. c.

[2]) Stromberg, l. c.

optimalen Punkt besitzt. Auch bei spontaner Gerinnung frischen Blutes können wir ein „Optimum“ feststellen. Nach Bürker und Kottmann[1]) liegt es bei 40°, was auch dem „Optimum“ bei der Kombination Fibrinogen + aktiviertes Serum entsprechen würde.

Die Quotienten, die ich aus den von Kottman angeführten Zahlen berechnet habe, stimmen mit meinen überein. Doch möchte ich auf diese Übereinstimmung bei den ganz verschiedenen Versuchsbedingungen keinen Wert legen. Auch Stromberg gibt zu, daß das von Rettger und von ihm beobachtete Phänomen bei der spontanen Gerinnung des Blutes nicht stattfindet. Nach seiner Meinung sind durch das Mitwirken der zelligen Elemente die Vorgänge bei der spontanen Gerinnung ganz verschieden von den Prozessen, die sich bei künstlicher Gerinnung abspielen.

Einige allgemeine Bemerkungen über das sogenannte „Optimum“ mögen hier am Platze sein.

Daß ein Optimum für eine bestimmte Fermentreaktion keine konstante Größe ist, ist seit den Untersuchungen von Tamann[2]) über die Wirkung des Emulsins bekannt. Nach Bredig[3]) wird das Optimum von den vielen Faktoren, die einer Reaktion zugegen sind, sehr stark beeinflußt. — Was bedeutet denn überhaupt das Auftreten der sogenannten optimalen Temperatur bei den Reaktionen, die als fermentativ bezeichnet werden?

Es ist von jeher bekannt, daß die Erhöhung der Temperatur eine Beschleunigung jeder chemischen Reaktion bewirkt. Dieser Einfluß wurde von van't Hoff und Arrhenius in gesetzmäßige Form gebracht. Nach dem sogenannten R.G.T.-Gesetze wird beim Erhöhen der Temperatur um 10° die Geschwindigkeit einer jeden chemischen Reaktion verdoppelt bis verdreifacht.

Dieses Gesetz ist aber für fermentative Reaktionen nur innerhalb gewisser Grenzen gültig[4]); denn einerseits treffen wir hier sehr hohe Quotienten, z. B. 5,3 für die Zerlegung des

---

[1]) Bürker und Kottmann, zit. nach Morawitz, Die Blutgerinnung. Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. S. 232.

[2]) Tamann, Zeitschr. f. physikal. Chem. **18**, 436, 1895.

[3]) Bredig, Elemente der chemischen Kinetik usw. Ergebnisse der Physiol. **1**, 1, 1902.

[4]) Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme. Ergebnisse der Physiol. **9**, 1910.

Caseins durch Trypsin[1]), andererseits sehr niedrige, wie 1,3 bei der Reaktion zwischen Esterase (Lipase) und Äthylbutyrat[2]), 1,4 für Rohrzucker und Invertase[3]).

Außerdem ist ein Quotient nur für eine rein chemische, nicht enzymatische Reaktion konstant, während er bei Enzymreaktionen mit steigender Temperatur beständig abnimmt, um bei einer gewissen Temperatur negative Werte zu erreichen[4]). Diese beständige Abnahme des Quotienten, sowie das Auftreten des „Optimums", ist nur ein Ausdruck davon, daß bei einem fermentativen Prozesse neben der Hauptreaktion eine oder mehrere Nebenreaktionen zutage treten. Der Einfluß der Temperatur auf eine Fermentreaktion ist ein zweifacher: er äußert sich in der Reaktionsbeschleunigung, aber auch in der Inaktivierung des Enzyms, die die Reaktion nur verlangsamen kann. Die beiden Prozesse, die Beschleunigung der Hauptreaktion und die Zerstörung des Enzyms verlaufen nebeneinander.

Wie Tamann[5]) für die Reaktion zwischen Emulsin und Salicin zeigte, folgt die Inaktivierung des Enzyms dem R.G.T.-Gesetze. In dem Zeitpunkt, wo bei steigender Temperatur die Abschwächung des Enzyms größere Wirkung auf die Reaktion ausübt, wie der beschleunigende Faktor, wird die Reaktion verlangsamt. Bevor es zu dieser Verlangsamung kommt, ist die Reaktion auf der Höhe der Geschwindigkeit.

Das ist der optimale Punkt, das Optimum[6]).

Für die Mehrzahl der Enzyme liegt die optimale Temperatur zwischen 37^0 und 53^0[7]), was auch im allgemeinen für das Thrombin stimmen würde; nur die Reaktion zwischen $MgSO_4$-Plasma und dem Schmidtschen Thrombin zeigt ein abweichendes Verhalten. Wir müssen also annehmen, daß eine Form der Inaktivierung des Thrombins bei dieser Reaktion rascher vor sich geht als bei anderen Kombinationen und schon bereits bei 18^0 dem beschleunigenden Einfluß der steigenden Temperatur gleichwertig wird.

---

[1]) Bayliss, Das Wesen der Enzymwirkung. Dresden 1910.
[2]) Kastle und Loevenhart, zitiert nach Euler, l. c.
[3]) Euler, l. c. S. 329.
[4]) Euler, l. c.
[5]) Tamann, l. c.
[6]) Bayliss, l. c.
[7]) Vernon, Intracelluläre Enzyme. Ergebnisse der Physiol. 9.

Als Ursachen der frühzeitigen, also noch unterhalb der optimalen Temperatur auftretenden Inaktivierung der Enzyme nimmt Bayliss folgende Prozesse an:

1. Reversibilität der Reaktion.
2. Verbindung des Enzyms mit den Produkten der Reaktion.
3. Negative Autokatalyse.
4. Zerstörung oder Änderung der Enzyme durch dritte Stoffe.

Die ersten drei Punkte kommen für die Erklärung der eigenartigen Abschwächung des Thrombins bei 18^0 wahrscheinlich kaum in Betracht. Anders dagegen verhält es sich mit dem vierten Faktor, der, wie die umfassenden Arbeiten von Hedin[1]) gezeigt haben, eine hervorragende Rolle in der Hemmung der Enzymwirkung spielt.

Schon frühere Autoren zeigten, daß die Enzyme von vielen kolloidgelösten oder feingepulverten Stoffen aufgenommen und infolgedessen abgeschwächt oder zerstört werden. Hedin[2]) machte wahrscheinlich, daß es sich hier nicht um eine Zerstörung der Enzyme durch diese Substanzen handelt, sondern um eine an den Vorgang der Adsorption erinnernde Bindung zwischen dem Enzym und den oben genannten Körpern. Die Bindung darf aber nicht mit der echten Adsorption, die sich in krystalloiden Systemen abspielt, identifiziert werden. Die Hauptunterschiede bestehen darin, daß die von Hedin[3]) beschriebene Bindung mit steigender Temperatur wächst, während die echte Adsorption in den Lösungen mit steigender Temperatur abnimmt; außerdem ist die Hedinsche Adsorption nur wenig reversibel.

Die hier behandelte Bindung kann auch nicht im Sinne der Michaelisschen[4]) „anomalen Adsorption" gedeutet werden. Es fehlen ihr die für „anomale Adsorption", die sich zwischen kolloidalen Körpern abspielt, charakteristischen Eigenschaften:

---

[1]) Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, **57**, **60**, **64**.

[2]) Hedin, Physikal. Chem. in der Biol. in Hammarstens Lehrbuch der physiol. Chem. VII. Aufl.

[3]) Hedin, Die Hemmung der Enzymwirkung. Ergebnisse der Physiol. **9**.

[4]) Michaelis, Dynamik der Oberflächen. S. 26 ff. Dresden 1909.

wie vollständige Irreversibilität, Unabhängigkeit der zu adsorbierenden Stoffe voneinander und schließlich die sogenannte Häutchenbildung.

Einfachheitshalber werden wir also die Bindung der Enzyme an dritte Körper im Sinne der Adsorption betrachten, gerade da Fälle beobachtet sind, bei denen „die Adsorption mit steigender Temperatur zunimmt, ohne daß man in diesen Fällen Grund hätte, neue Faktoren mit in Rechnung zu ziehen“ (Freundlich[1]).

Hedin fand, daß fein gepulverte tierische Kohle eine starke Trypsinlösung zu inaktivieren imstande ist. Diese Inaktivierung ist durch Adsorption des Trypsins an die Kohle hervorgerufen. Nach Hedins Untersuchungen ist diese Bindung, die mit steigender Temperatur wächst, nur zum Teil reversibel: so z. B. läßt sich das Trypsin durch Wasser von der Kohle nicht befreien, wenn man aber die mit Trypsin beladene Kohle mit angesäuertem und darauf neutralisiertem Eierklar oder entsprechend behandeltem Serum versetzt, so wird das Trypsin wiederum frei.

Natives Eierklar adsorbiert z. B. das Labferment; und so werden recht starke Lablösungen durch Zusatz von Eierklar inaktiviert. Wenn man aber diese durch Eierklar inaktivierte Lablösung mit Säure behandelt nnd darauf neutralisiert, so wird die Bindung zwischen dem Adsorbens und dem adsorbierten Stoff gesprengt, das Lab freigemacht und die Lösung wieder aktiv.

Diese Reaktivierung der Fermente ist folgendermaßen zu erklären: Zwei adsorbierbare Stoffe beschränken sich in ihrer Adsorbierbarkeit, wenn sie gemischt sind, und derjenige Stoff, der mehr „Affinität“ zum Adsorbens hat, wird gebunden. Er ist imstande, einen anderen, weniger fest gebundenen Stoff vom Adsorbens zu verdrängen[2]).

In unserer Kombination wirkt Kohle als Adsorbens, das Ferment und das angesäuerte Eierklar oder Serum wirken als adsorbierbare Stoffe.

Das Serum und das Eierklar müssen vorher angesäuert und neutralisiert werden, sonst adsorbieren sie das Ferment.

---

[1]) Freundlich, Kapitel: Adsorption im Handwörterbuch der Naturwissenschaften **1**, 62.

[2]) Höber, Physik. Chemie der Zelle und Gewebe. III. Aufl., S. 278.

Durch diese Behandlung verlieren sie ihr aktives Adsorptionsvermögen gegenüber dem Enzym und werden nur von anderen Stoffen aufgenommen.

Daß natives Serum Körper enthält, die die Enzyme inaktivieren können, ist schon seit langem bekannt. Die hemmende Kraft des Serums wurde nachgewiesen von Hammarsten[1]) für Lab, Hedin[2]) für Trypsin, Erickssen[3]) für Emulsin usw. Diese Eigenschaft ist an Serumalbumin gebunden (Landsteiner[4]).

Alle diese Tatsachen, so kompliziert und wenig aufgeklärt wie sie sind, zeigen weitgehende Analogien mit den Prozessen, die sich bei der Gerinnung des Blutes abspielen. Besonders deutlich tritt die Analogie in der Reaktivierung des schwach aktiven Serums zutage.

Nach Morawitz wird das Thrombin im Serum (nach längerem Stehen) in eine unwirksame Form (Metathrombin) umgewandelt. Im Anschluß an die Untersuchungen von Hedin kann man, glaube ich, annehmen, daß es sich hier um eine Inaktivierung des Thrombins handelt, die durch Adsorption von seiten der Serumeiweißkörper verursacht ist. Durch Alkalisieren und Ansäuern verlieren die in Frage kommenden Eiweißkörper ihre bindende Kraft, und das Thrombin wird frei. Nach dieser Auffassung würde das Metathrombin nur durch Adsorption inaktiviertes Thrombin vorstellen. Diese Bindung ist nicht ganz irreversibel, und durch das Verfahren von Alex. Schmidt, nämlich durch Alkali- oder Säurewirkung gesprengt; in ähnlicher Weise wird das an Eierklar gebundene Lab durch Ansäuern und darauf folgendes Neutralisieren mit Alkali freigemacht.

V. Versuche über die Hemmung der Thrombinwirkung durch Adsorption.

Um mich zu überzeugen, daß das Thrombin adsorbierbar ist, habe ich Versuche angestellt, die die Fähigkeit des Thrombins, durch andere Stoffe adsorbiert zu werden, zeigen sollen.

---

[1]) Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chem. 7. Aufl., S. 69.
[2]) Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60.
[3]) Erickssen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 72.
[4]) Landsteiner, Centralbl. f. Bakt. 27.

Versuchsanordnung.

10 ccm eiweißarmer Thrombinlösung (Schmidt) werden mit 2 Messerspitzen feingepulverter tierischer Kohle versetzt. Die Mischung wird ca. $^1/_2$ Stunde bei Zimmertemperatur gehalten, nachher durch doppelte Filter filtriert. Es zeigte sich, daß die gerinnungserzeugende Kraft des Filtrates gegenüber der ursprünglichen, mit Kohle nicht behandelten Thrombinlösung erheblich vermindert ist.

2 ccm unbehandelter Thrombinlösung erzeugen in 2 ccm $MgSO_4$-Plasma eine totale Gerinnung in 7 Minuten, während dasselbe Quantum des Filtrates erst in 45 Minuten eine totale Gerinnung 2 ccm $MgSO_4$-Plasmas zu bewirken vermag. Wenn man das Gemisch Kohle + Thrombinlösung mit etwas altem, an sich inaktivem Serum versetzt und erst nachher filtriert, so wird ein Teil des gebundenen Thrombins durch Serumproteine verdrängt, und das Filtrat ist wieder aktiv, jedoch nicht so stark, wie die ursprüngliche Lösung.

Substrat	Thrombinlösung	Geronnen in
2 ccm $MgSO_4$-Plasma +	2 ccm Filtrat (mit Serum vorbehandelt)	16,5′
2 ccm $MgSO_4$-Plasma	+ 2 ccm Filtrat (ohne Serum)	4,4′

Auch feingepulvertes Casein (Hammarsten) setzt die Wirksamkeit des Thrombins stark herab. Wenn man aber einer Mischung „Casein-Thrombin“ vor dem Filtrieren etwas NaOH zugibt und nachher mit HCl oder mit H_2SO_4 zurückneutralisiert, so ist das Thrombin wieder vorhanden.

Die obigen Versuche zeigen, daß das Thrombin wie auch Trypsin, Lab und Emulsin von Kohle und Casein, auch von Serumalbumin (Merck) aufgenommen und dadurch inaktiviert bzw. abgeschwächt werden. Diese adsorptive Bindung läßt sich sprengen durch die Methode, die von Schmidt allerdings unter ganz anderen theoretischen Voraussetzungen für das Reaktivieren des Metathrombins im Serum ausgearbeitet worden ist.

Da nun die Bindung eines Enzymes an ein Adsorbens mit steigender Temperatur zunimmt, so lag der Gedanke nahe, die rätselhafte Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit, die bei der Gerinnung von $MgSO_4$-Plasma durch das Thrombin bei 18^0 auftritt, durch die Adsorption des Thrombins erklären zu können.

Daß das Serum gerinnungshemmende Stoffe besitzt, war schon Schmidt bekannt, das soll auch folgender Versuch zeigen.

$t^0 = 17^0$	2 ccm Thrombin $+ {}^1/_2$ „ NaCl (0,9%) 2 „ Thrombin $+ {}^1/_2$ „ altes Serum	Fibrinogen 2 ccm 2 „	Gerinnungszeiten 10′, 8′ 31′, 24′

Die thrombinbindende Kraft des Serums steigt mit der Temperatur an, wie die Tabelle XX zeigt.

Tabelle XX.

Temperatur °C	2 ccm Thrombin + 2 „ Fibrinogen + $^1/_2$ „ 0,9% NaCl	2 ccm Thrombin + 2 „ Fibrinogen + $^1/_2$ „ Serum
	Gerinnungszeiten in Minuten	
16	10	30
20	7	27
27	$5^1/_2$	24
30	4	20
33	$3^1/_2$	20
36	3	20

Während bei 16^0 das Verhältnis zwischen den beiden Gerinnungszeiten (30 und 10) 3 beträgt, wird es bei 20^0 zu 4 Minuten, bei 30^0 zu 5 Minuten und bei 36^0 gleicht es $6^2/_3$ Minuten. Der Temperaturquotient für die erste Reihe beträgt 1,75, für die zweite Reihe nur 1,35.

Während die Reaktionsgeschwindigkeit in der ersten Reihe bis 30^0 ansteigt, zeigt sich in der zweiten Reihe eine Verlangsamung der Reaktion schon bei 30^0.

Die erste Reihe zeigt ein Verhalten, das für die Reaktion zwischen dem Fibrinogen und dem Thrombin charakteristisch ist, die zweite Reihe dagegen erinnert an den Verlauf der Reaktion bei der Kombination Thrombin + $MgSO_4$-Plasma.

Daß die Hemmung der Wirkung von Thrombin unter natürlichen Verhältnissen, also im normalen Serum, mit steigender Temperatur stärker wird, zeigt folgender Versuch.

Frisches Kaninchenserum wird in den Eisschrank gestellt. Je 2 ccm desselben Serums werden in Reagensgläsern bei verschiedenen Temperaturen gehalten. Nach 30 Minuten werden alle Gläser auf eine bestimmte (Zimmer-)Temperatur gebracht. Es zeigt sich, daß diejenigen Röhrchen das stärkste (thrombinreichste) Serum enthalten, die in der Kälte gehalten worden sind.

Tabelle XXI.

Temperatur °C	Serum ccm	Fibrinogen ccm	Gerinnungszeit Minuten
5	1	2	14
10	1	2	18
20	1	2	31
30	1	2	80

Auf die nach Schmidt aktivierten Sera übt die Temperatur bis 30° keinen ausgesprochen hemmenden Einfluß. Die vorerwärmten Sera lassen sich durch Abkühlen nicht, oder nur wenig reaktivieren.

Die Bindung des Thrombins an die Eiweißkörper ist danach adsorptiver Natur. Sie ist nur zum Teil reversibel; sie steigt mit der Temperatur an.

Aus allen diesen Tatsachen geht hervor, daß das Serum außer einem gerinnungserregenden Stoff, dem Thrombin, noch einen oder mehrere gerinnungshemmende, thrombinbindende Substanzen besitzt[1]). Diese Körper befinden sich natürlich auch im Plasma[2]), in unserem Falle im $MgSO_4$-Plasma, das außerdem noch über das gerinnungshemmende Magnesiumsulfat verfügt.

Bei der Reaktion zwischen der eiweißarmen Schmidtschen Thrombinlösung und dem $MgSO_4$-Plasma spielen sich nicht ein, sondern mindestens zwei Prozesse ab. Der erste, die Reaktion zwischen dem Thrombin und dem im Plasma im „Sol"zustande sich befindenden Fibrinogen, scheint chemischer Natur zu sein. Der zweite Prozeß spielt sich zwischen dem Thrombin und (wahrscheinlich) Serumproteinen ab; er besteht in einer Bindung des Thrombins mit den Proteinen, die mit der Temperatur ansteigt. Wenn wir in dem ersten Prozesse die Hauptreaktion sehen, so müssen wir den zweiten als eine hemmende Nebenreaktion betrachten. Um 20° erreichen die beiden Prozesse die gleiche Kraft. Graphisch, in Kurvenform dargestellt, kreuzen sich aber die Kurven beider Prozesse bei 18° nicht, sie verlaufen bis 30° nebeneinander, weswegen auch die Reaktionsgeschwindigkeit die gleiche bleibt. Oberhalb 30°

[1]) Auch A. Schmidt hat einen gerinnungshemmenden Körper im Serum angenommen (Cytoglobin); Nolf nennt ihn Antithrombosin.

[2]) Morawitz, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 1903.

wird der hemmende Einfluß stärker als die Hauptreaktion und die Reaktionsgeschwindigkeit beginnt zu sinken.

Außer Adsorption an Eiweißkörpern gibt es noch viele andere Momente, die an der Inaktivierung des Thrombins teilnehmen, gerade aber in unserem Falle scheint die Adsorption eine nicht zu unterschätzende Rolle zu spielen.

Das wird noch klarer erscheinen, wenn wir die Gerinnung in den Kombinationen berücksichtigen, bei denen eine adsorptive Bindung des Thrombins praktisch vernachlässigt werden kann.

Nehmen wir die Kombination Thrombin (Schmidt) und Fibrinogenlösung an; weder in der eiweißarmen Thrombinlösung noch in der Fibrinogenlösung sind nennenswerte Mengen Stoffe vorhanden, die das Thrombin zu binden imstande sind. In diesem Falle haben wir es in der Hauptsache mit einer einfachen Reaktion zu tun, die bei 37° ihr Optimum hat. Ganz anders verläuft die Reaktion, wenn die Thrombinlösung eiweißreich ist: hier müssen wir mit einer Adsorption des Thrombins an Albumine (denn die kämen nur in Betracht[1]), rechnen; dementsprechend konstatieren wir hier eine Verlangsamung der Reaktion schon unterhalb 37°.

Bei der Reaktion zwischen dem aktivierten Serum und der Fibrinogenlösung, die ihr Optimum bei 40° hat, kommt es ebenfalls nicht zu einer Inaktivierung des Thrombins durch Adsorption: durch das „Aktivieren" sind große Mengen von Thrombin frei geworden; außerdem sind die mit Lauge und Säure vorbehandelte Eiweißkörper nicht imstande, das Thrombin zu binden.

Diese Hemmungskörper des aktivierten Serums, obwohl sie für das Thrombin unschädlich sind, können in eine Adsorptionsverbindung mit anderen Eiweißkörpern zusammentreten, auch mit denjenigen Proteinen des Plasmas, die ihrerseits das Thrombin adsorbieren können. Und so können wir den Vorgang erklären, daß in der Kombination aktiviertes Serum + Plasma die Hemmung des Thrombins praktisch nicht erfolgt.

---

[1]) Landsteiner, Centralbl. f. Bakt. 27, 156; zit. nach Hammarsten, l. c. S. 70.

Die Hemmungskörper des Plasmas können aber auch durch natives Serum gebunden werden. Dieser Vorgang spielt sich z. B. bei der Reaktion zwischen dem $MgSO_4$-Plasma und dem frischen Serum ab. Das Thrombin ist infolgedessen frei, die Reaktion erfährt bei 20^0 keine Hemmung.

Von diesem Standpunkte aus ließen sich auch andere Vorgänge bei der Blutgerinnung erklären. So z. B. das Phänomen von Bordet und Gengou[1]). Wenn man eine bestimmte Menge Serum (Serum A) zum Plasma zusetzt, so erfolgt natürlicherweise die Gerinnung; wenn man von diesem Gerinnsel das Serum abpreßt, so zeigt es sich, daß es (Serum B) wirksamer ist wie das primäre Serum (Serum A). Man könnte sich diesen Vorgang so vorstellen, daß im Serum A nur ein Teil des Thrombins im freien Zustande sich befindet, während der andere Teil durch Serumalbumine adsorbiert ist. Die Proteine des Plasmas, die wahrscheinlich größere Affinität wie das Thrombin zu den Serumeiweißkörpern besitzen, verbinden sich mit den Eiweißstoffen des Serums und verdrängen dadurch das Thrombin aus seiner Adsorptionsverbindung. Das Thrombin wird somit frei und das Serum B erscheint auch thrombinreicher wie das Serum A.

Zusammenfassung.

Die Temperaturkurve der Reaktionsgeschwindigkeit der Blutgerinnung ist eine Resultante aus mindestens zwei nebeneinander verlaufenden Reaktionen. Die eine, die Hauptreaktion, spielt sich zwischen dem Thrombin und dem Fibrinogen ab und ist aller Wahrscheinlichkeit nach chemischer Natur; die andere Reaktion, die der ersten entgegengesetzt wirkt, besteht in einer Hemmung der Thrombinwirkung infolge Adsorption des Thrombins durch gewisse Eiweißstoffe des Serums. Die Erhöhung der Temperatur, die die beiden Reaktionen beschleunigt, übt auf den gesamten Prozeß der Blutgerinnung einen zweifachen Einfluß aus: einen beschleunigenden, indem sie ein Ansteigen der Hauptreaktion bewirkt, und einen verzögernden, indem sie die gerinnungshemmende Nebenreaktion steigert.

---

[1]) Bordet und Gengou, Recherches sur la Coagulation du Sang Annales Institut Pasteur **18**, 15.

Die Temperaturkurve ist somit in hohem Grade von der Versuchsanordnung abhängig. In Kombinationen, bei denen die Adsorptionsmöglichkeit des Thrombins vermindert bzw. ausgeschaltet ist, verläuft die Reaktion der Gerinnung gleich einer fermentativen Reaktion, die zwischen 35 und 40° ihr „Optimum“ besitzt. Bei der Kombination $MgSO_4$-Plasma + Schmidts Thrombin tritt infolge günstiger Verhältnisse für die Adsorption des Thrombins durch Eiweißkörper des Plasmas bei 17° bis 20° eine Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit ein.

Die Adsorption des Thrombins durch Proteine des Serums steigt mit der Temperatur; sie ist nur zum Teil reversibel.

Die Umwandlung des Thrombins des Blutserums in das inaktive Metathrombin ist durch Adsorption des Thrombins hervorgerufen. Das „Aktivieren“ des inaktiven Serums nach A. Schmidt besteht in einer Sprengung der Adsorptionsbindung des Thrombins.

Die Hemmung der Thrombinwirkung durch Adsorption spricht nicht gegen den enzymatischen Charakter des Thrombins, da auch viele andere Fermente durch Adsorption in ihrer Wirkung gehemmt werden.

Das eigentümliche Zeitgesetz, die Temperaturkurve, die relative Niedrigkeit der Temperaturkoeffizienten, sowie ihr rasches Abfallen mit steigender t^0, alle diese Momente, die angeblich gegen die Fermentnatur des Thrombins sprechen sollten, verdanken ihren Ursprung der Adsorption des Thrombins durch die Eiweißkörper des Serums.